



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 44 486.9

Anmeldetag: 10. September 2001

Anmelder/Inhaber: Forschungszentrum Karlsruhe GmbH,
Karlsruhe, Baden/DE

Bezeichnung: Verfahren zum kontinuierlichen nichtthermischen
Aufschluss und Pasteurisieren industrieller Mengen:
organischen Prozessguts durch Elektroporation und
Reaktor zum Durchführen des Verfahrens

IPC: B 01 J 19/08

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. September 2002
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Wallner

Forschungszentrum
Karlsruhe GmbH
ANR 5661498

Karlsruhe, den 10. Sept. 2001
PLA 0151 Mh/he

**Verfahren zum kontinuierlichen nichtthermischen Aufschluß und
Pasteurisieren industrieller Mengen organischen Prozessguts
durch Elektroporation und Reaktor zum Durchführen des
Verfahrens**

Forschungszentrum
Karlsruhe GmbH
ANR 5661498

Karlsruhe, den 10. Sept. 2001
PLA 0151 Mh/he

Patentansprüche:

1. Verfahren zum kontinuierlichen nichtthermischen Aufschluß und Pasteurisieren industrieller Mengen organischen Prozessguts durch Elektroporation, wobei das Prozeßgut in und mit einer Transport-/Prozeßflüssigkeit durch einen Reaktor geströmt und darin der Wirkung gepulster elektrischer Felder ausgesetzt wird, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen in einem Längsbereich des Reaktors verteilten geerdeten Elektroden und in einem gegenüberliegenden Längsbereich des Reaktors verteilten, mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektrodengruppen aus jeweils mindestens einer Elektrode pulsartig elektrische Felder stets nur zwischen einer Elektrodengruppe und den geerdeten Elektroden erzeugt werden, indem eine an die jeweilige Elektrodengruppe über einen zugehörigen Schalter angeschlossene elektrische Energiequelle ohne zeitliche Überlappung mit den andern Elektrodengruppen entladen wird, (wobei die Feldachsen von einer Elektrodengruppe zu den geerdeten Elektroden niemals senkrecht auf der Durchgangsachse durch den Reaktor stehen) die Aufladung der elektrischen Energiequellen zwischen zwei jeweiligen unmittelbar aufeinanderfolgenden Entladungen so hoch eingestellt wird, dass im Bereich zwischen einer Elektrodengruppe und mindestens den nächst gelegenen geerdeten Elektroden bei der Entladung eine elektrische Feldstärke E zustande kommt, dass entlang der Längsachse der Zellen, der Hauptachse z , des gerade in diesem Feldbereich befindlichen Prozessguts während der Dauer von höchstens $1 \mu s$ die Schwellenpotentialdifferenz

$$\Delta\phi_s = 10 \text{ V}$$

zur irreversiblen Öffnung der Zellwand mindestens überschritten wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Aufladung der elektrischen Energiequellen zwischen zwei jeweiligen unmittelbar aufeinanderfolgenden Entladungen so hoch eingestellt wird, dass im Bereich zwischen einer Elektrodengruppe und mindestens den nächst gelegenen geerdeten Elektroden bei der Entladung eine elektrische Feldstärke E zustande kommt, dass entlang der Längsachse der Zellen, der Hauptachse z , des gerade in diesem Feldbereich befindlichen Prozessguts während der Dauer von höchstens $1 \mu s$ die Potentialdifferenz ϕ

$$\Delta\phi \geq 100 \text{ V}$$

Zustande kommt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Dimensionierung eines aus einem Marx-Generator und der daran über eine Funkenstrecke angeschlossenen Elektrodengruppe derart eingehalten wird, dass der Spannungsanstieg bis zum Spannungsmaximum von höchstens 1 MV höchstens 100 nsec dauert.

4. Reaktor zum kontinuierlichen, nicht-thermischen Aufschluß und zum Pasteurisieren industrieller Mengen organischen Prozessguts durch Elektroporation, wobei das Prozessguts aus biologischen Zellen in Pflanzen, Wurzeln, Knollen, Früchten und tierischem Material besteht, der Reaktor tunnelförmiger Bestandteil einer Prozessgut-Transportstraße ist, die im Reaktorbereich durch die Transport-/Prozessgutflüssigkeit geflutet ist und durchströmt wird, und das Prozessguts darin der Wirkung gepulster elektrischer Felder ausgesetzt ist, dadurch gekennzeichnet, dass der Reaktor tunnelförmig ist und runden oder polygonalen und

dann mindestens viereckigen Querschnitt hat und aus dielektrischen Material besteht,
über die Länge des Reaktors in einem ersten Längsbereich der Reaktorwand geerdete Elektroden eingelassen sind, die mit ihrer/m Stirn/Kopf in den lichten Raum des Reaktors exponiert sind,
über die Länge des Reaktors in einem zweiten Längsbereich der Reaktorwand mit Hochspannung beaufschlagbare Elektroden eingelassen sind, die mit ihrer/m Stirn/Kopf in den lichten Raum des Reaktors exponiert sind,
alle mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektroden zu Gruppen aus mindestens einer Elektrode zusammengefasst sind und die Gruppen so angeordnet sind, daß der Abstand dieser Gruppen untereinander in etwa der lichten Weite d entspricht,
der Längsbereich mit den mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektrodengruppen beidseitig von dem Längsbereich mit geerdeten Elektroden durch je einen elektrodenlosen Längsbereich getrennt sind, der über die Länge des Reaktors jeweils mindestens eine Breite derart hat, dass während der Prozessierung zwischen zwei unterschiedlichen Elektrodengruppen kein elektrischer Durchschlag auftreten kann, sich aber die für die Elektroporation geforderte Feldstärke von ≥ 10 kV/cm aufbauen und halten kann,
die Lage des Längsbereiches mit geerdeten Elektroden zu der Lage des Längsbereiches mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektrodengruppen derart ist, dass jede geradlinige Verbindung zwischen einer geerdeten Elektrode und einer Elektrodengruppe im lichten Bereich des Reaktors verläuft und niemals senkrecht zu der Durchströmungsachse durch den Reaktor steht.

5. Reaktor nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das die mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektroden in Gruppen aus mindestens einer Elektrode aufgeteilt sind und jede Gruppe über ein Hochspannungskabel und einem/r Schal-

ter/Funkenstrecke mit ihrer/m eigenen Hochspannungsquelle/Marx-Generator verbunden ist.

6. Reaktor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche jeder mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektrodengruppe etwa gleich der Summe der am nächsten benachbarten exponierten Oberflächen geerdeter Elektroden ist.

7. Reaktor nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Aspektverhältnis von Elektrodenfläche F zu Abstand d zwischen der jeweiligen Hochspannungselektrode und den am nächsten benachbarten, geerdeten Elektroden den Wert:

$$F : d = 1/2 \text{ cm}$$

nicht und bei Einrechnung der übernächsten geerdeten Elektroden diesen Wert nicht wesentlich unterschreitet.

8. Reaktor nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden derart auf dem jeweiligen Längsbereich verteilt sind, dass es kein Elektrodenpaar aus einer geerdeten und einer mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektrode gibt, deren gerade Verbindungslinie senkrecht zur Strömungsrichtung des Prozessguts bzw. senkrecht zur Transportachse im Reaktor steht.

9. Reaktor nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die mit den mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektrodengruppen derart auf ihrem Längsbereich verteilt sind, dass bei der Projektion senkrecht zur Achse der Durchströmung durch den Reaktor auf den Längsbereich mit geerdeten Elektroden keine Elektrodengruppe mit einer geerdeten Elektrode zur Deckung kommt.

Beschreibung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Aufschluß biologischer Zellen im industriellen Maßstab mit gepulsten elektrischen Feldern und einen Reaktor in einer Prozessesstrasse zur Durchführung des Verfahrens.

Gepulste elektrische Felder mit Feldstärken im Bereich von 1 - 100 kV/cm führen zu irreversiblen Porenöffnungen in der Membran biologischer Zellen. Dieser mit Elektroporation bezeichnete Effekt wird zur effektiven Gewinnung der Inhaltsstoffe pflanzlicher Zellen und zur Abtötung von Mikroorganismen, Pasteurisieren, verwendet.

Andere Verfahren zur Freisetzung des Zytoplasmas sind thermische Behandlung oder Abpressung. Bei etwa 72 Grad Celsius denaturieren die Zellmembranen pflanzliche Zellen, und der Zellinhalt fließt aus. Bei der Abpressung führt ein äußerer Druck zum mechanischen Zerreißen der Zellwände und der Freigabe Zellinhalts. Beide klassischen Verfahren haben gravierende Nachteile: die thermische Behandlung ist energieintensiv und kann wertvolle, temperatursensitive Inhaltsstoffe schädigen. Die mechanische Abpressung ist, von der Anlagentechnik her gesehen, aufwendig und der Grad des Aufschlusses ist meist deutlich niedriger als beim thermischen Aufschluß. Die Kombination beider Verfahren besteht aus dem Kaltpressen und nachträglichen Auslösen der Inhaltsstoffe durch Lösungsmittel.

Das Verfahren der Elektroporation ist seit den sechziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts bekannt, und seither wird das Phänomen der Permeabilisierung bzw. der Poration von Zellmembranen wissenschaftlich untersucht. In der DB 12 37 541 wird die Elektroporation für gängige Landwirtschaftsprodukte wie die Erschließung der Stärke bei Kartoffeln beschrieben. In der WO 99/6463 wird ein weiteres Verfahren zur Elektroporation be-

schrieben. Es werden die Vorteile dargelegt, mit diesem Verfahren Zuckerrüben zu prozessieren, bevor sie anschließend thermisch oder mechanisch weiter prozessiert werden. Dabei spiegelt die thermische Behandlung den Stand der Technik wider. Das mechanische Verfahren ist in der DE 197 36 080 A1 ebenfalls beschrieben.

Im Bereich der Elektroporation ist noch kein Verfahren und auch keine Anlage bzw. ein Reaktor bekannt, mit dem im industriellen Maßstab prozessiert werden könnte. Womit die Aufgabe formuliert ist, die der Erfindung zu Grunde liegt, nämlich ein Verfahren zur Elektroporation zellulärer biologischer Substanzen und einen Reaktor in einer Prozessesstrasse zur Durchführung des Verfahrens bereit zu stellen.

Anstelle der Fruchtdrehung durch Strömungsturbulenz oder Zwangsverwirbelung des Prozessgutstromes haben hier die elektrischen Felder im Reaktor über seine Länge unterschiedliche Richtung. Es ist z. B. Stand der Technik, die Frucht in einem dielektrischen Rohr zu transportieren an im Winkel versetzten Elektrodenpaaren angebracht sind, die jeweils in der benachbarten Querschnittsebenen übereinander liegen. Damit werden bei den vorbeigeförderten Rüben die Winkel in einer Ebene variiert und es werden die Zellen, die in dieser Ebene orientiert sind, erfaßt. Die mit ihrer langen Achse, übereinkommend der z-Achse, senkrecht zu dieser Ebene orientierten Zellen werden aber nicht aufgeschlossen.

Die Erfindung löst die Aufgabe, biologische Zellen mittels gepulster Elektroporation so zu modifizieren, daß im industriellen Maßstab prozessiert werden kann. D. h. große, industriell zu verarbeitende Mengen werden bei minimalem Energieverbrauch in einem dazu konzipierten, mit dem Verfahren betriebenen Reaktor prozessiert.

Bei dem Verfahren zum kontinuierlichen Aufschluß und zur Pasteurisieren solcher großen Mengen von biologischen Zellen in Pflanzen, Wurzeln, Knollen, Früchten und tierischen Zellen, dem organischen Prozessgut, wird dasselbe mit einer Transport-/Prozeßflüssigkeit durch einen Reaktor geströmt und dort zur Elektroporation gepulster elektrischer Felder ausgesetzt ist.

Die einzelnen Schritte sind:

Zwischen geerdeten und mit Hochspannung beaufschlagbaren, in der dielektrischen Reaktorwand eingelassenen Elektrodengruppen aus jeweils mindestens einer Elektrode im lichten Bereich des Reaktors werden pulsartig elektrische Felder E vielfältiger Richtung der Stärke erzeugt, dass jede Zelle beim Durchgang durch den Reaktor mit hoher Wahrscheinlichkeit mindestens einmal eine elektrische Feldstärke E derart erfährt, dass auch entlang ihrer längsten Achse mindestens einmal die Schwellenpotentialdifferenz

$$z E = 10 \text{ V}$$

für die Elektroporation erreicht wird. Dadurch werden die biologischen Zellen des Prozessguts, die längliche, beispielsweise ovale Gestalt in der Größenordnung von typisch 10-100 μm haben, wiederholt einer Potentialdifferenz von mindestens 10 V ausgesetzt.

Die mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektroden werden zu Gruppen aus mindestens einer Elektrode zusammengefasst, und die Elektroden einer solchen Gruppe gleichzeitig an Hochspannung gelegt, bzw. mit dem Hochspannungspuls beaufschlagt, jedoch liegt stets nur eine Gruppe an Hochspannung.

Die Elektrodengruppen werden nacheinander wie bei einem Lauffeuer mit einer zeitlichen Streuung von mindestens bis mehrfach der Pulslänge mit Hochspannung beaufschlagt, auf jeden Fall so, dass das Feld sicher nur immer von einer Elektrodengruppe ausgeht. Dabei kann die Laufrichtung der Hochspannungs-

beaufschlagung in Richtung der Strömung des Prozessguts sein oder entgegen dieser oder aber die Elektrodengruppen werden statistisch beaufschlagt, so dass im Reaktor ab dem Eingang bis zum Ausgang im Rhythmus der Hochspannungsbeaufschlagung der Gruppen aufgrund der Elektrodenanordnung ständig Richtungsänderungen der elektrischen Feldstärke E auftreten. Wesentlich ist, dass immer nur eine Elektrodengruppe mit Hochspannung beaufschlagt ist, damit werden gegenseitige Feldverdrängungen und damit Bereich mit Feldlinienverläufen senkrecht zur Durchströmungsachse, wie sie bei gleichzeitiger Feuerung zweier oder mehrerer Elektrodengruppen auftreten würden, vermieden. Von der Länge der elektrischen Einwirkung her gesehen, ist die Lauffeuerrichtung in Strömungsrichtung des Prozessguts eine bevorzugte, weil dann das durchströmende Prozessgut aufgrund der Mitbewegung zeitlich länger der elektrischen Einwirkung ausgesetzt ist.

Experimentelle Parameteruntersuchungen, sowie amerikanische Literaturquellen (K. H. Schoenbach et al. „Bacterial Decontamination of Liquids with Pulsed Electric Fields“, IEEE Transactions on Dielectrics, Vol. 7, Nr. 6, p. 637 - 645, Oct. 2000) legen nahe, die Dauer des jeweiligen Hochspannungsimpulses im Bereich von 1 bis 3 μsec bei der Schwellenpotentialdifferenz von 10 V zu halten. Das ist für den Aufschluss des Prozessguts energetisch günstig (Anspruch 2). Dabei ist es vorteilhaft, wenn der Spannungsanstieg so schnell wie möglich, höchstens aber 100 μsec dauert.

Die geerdeten Elektroden sind keiner mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektrode oder einer Gruppe daraus eindeutig zugeordnet. Vielmehr korrespondiert eine Hochspannungselektrode/-gruppe mit den räumlich am nächsten liegenden, geerdeten Elektroden durch starke Felddausbildung bei Hochspannungsbeaufschlagung stark und mit den weiter wegliegenden entsprechend schwächer. Das macht den Umspringeffekt bzw. eine räumliche

Fluktuation der elektrischen Felder aus. Die grundsätzlich auftretende Feldüberhöhung an den geerdeten Elektroden und der gerade auf Hochspannungspotential liegenden Elektrodengruppe im Vergleich zu der im mittleren Bereich auf der jeweiligen Strecke dazwischen läßt die Elektroporation eben auch noch bei weiter entfernt liegenden geerdeten Elektroden zu (siehe hierzu auch die unten stehenden Erläuterungen zu Figur 5, Feldstärkeverlauf).

Neben dem Effekt der Feldüberhöhung an weiter entfernt liegenden geerdeten Elektroden in der Nähe derselben wird auch noch die elektrische Feldstärke um einem Faktor 10 angehoben.

Damit wird abgesichert, dass im Bereich weiter entfernter, geerdeten Elektroden das Zellgut zuverlässig elektroporiert wird.

Im Bereich der benachbarten Elektroden erzeugt man Schwellenpotentialdifferenzen von 100 V und mehr. Wegen der „Überpotentiale“, hat sich gezeigt, dass die Pulszeit weniger als 1 μ s betragen darf. Ein Vergleich der Aufschlussqualität zwischen der Schellenpotentialdifferenz 10 und 100 V ergibt bei gleicher spezifischer Energie einen Vorteil bei der letzteren (Anspruch 2). Der elektrische Energiespeicher der jeweiligen Elektrodengruppe soll schnell über den zugehörigen Schalter entladen. Der jeweilige Entladekreis ist deshalb so dimensioniert, dass der Spannungsanstieg bis zum Maximum von höchstens 1 MV in höchsten 100nsec erfolgt (Anspruch 3).

Der Reaktor zum Aufschließen und Pasteurisieren also zur optimalen Durchführung des Verfahrens der Elektroporation ist folgendermaßen aufgebaut (nebengeordneter Anspruch 4):

Der Reaktor ist tunnelförmig und hat einen polygonalen, mindestens jedoch viereckigen oder einen runden Querschnitt.

Das Material der Wand ist dielektrisch und chemisch inert gegenüber der Prozessflüssigkeit und dem darin mitgeführten Prozessgut. In einem ersten Längsbereich der Reaktorwand sind über die Länge des Reaktors geerdete Elektroden eingelassen, die mit ihrer/m Stirn/Kopf in den lichten Raum des Reaktors exponiert sind.

In einem zweiten Längsbereich der Reaktorwand sind über die Länge des Reaktors mit Hochspannung beaufschlagbare Elektroden eingelassen sind, die mit ihrer/m Stirn/Kopf in den lichten Raum des Reaktors exponiert sind. Sie sind allgemein in Gruppen aus mindestens einer solchen Hochspannungselektrode unterteilt. Die Elektroden einer Gruppe liegen an ein und derselben Hochspannungsquelle. Jede Gruppe an Hochspannungselektroden hat ihre eigene Hochspannungsquelle.

Alle mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektrodengruppen sind so angeordnet, daß der Abstand dieser Gruppen untereinander in etwa der lichten Weite d des Reaktors entspricht.

Der Längsbereich mit den mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektrodengruppen ist beidseitig von dem Längsbereich mit geerdeten Elektroden durch je einen elektrodenlosen Längsbereich getrennt. Dieser hat über die Länge des Reaktors jeweils mindestens eine Breite derart, dass sich während der Prozessierung zwischen einer geerdeten Elektrode und der gerade mit Hochspannung beaufschlagten Elektrodengruppe die Feldstärke von 10 kV/cm einstellt und aufrecht erhält, d.h. es kann kein elektrischer Durchschlag auftreten.

Die Lage des Längsbereiches mit geerdeten Elektroden ist zu der Lage des Längsbereiches mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektrodengruppen derart, dass jede geradlinige Verbindung zwischen einer geerdeten Elektrode und einer mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektrode aus irgend einer Gruppe im lichten

Bereich des Reaktors verläuft. Konstruktiv wird das Verhältnis der lichten Weite zur Reaktortiefe d eingehalten, dass der Abstand der hochliegenden Elektroden einer Gruppe zu der/n nächstliegenden geerdeten Elektrode/n derart ist, dass das Entstehen von Streufeldern mit $< 10 \text{ kV/cm}$ im Prozessgut unterbleibt.

In den Unteransprüchen 6 bis 9 sind vorteilhafte Maßnahmen beschrieben, die je nach Reaktorgröße Verfahrensschritte erleichtern:

Für einen in seinen Dimensionen großen Reaktor ist es zur gezielten Beschränkung der Feldliniendichte nützlich, statt jeweils einer einzelnen mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektrode Gruppen von jeweils gleichzeitig mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektroden zu haben. Dabei ist durchweg vorgesehen, dass die mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektroden in Gruppen aus mindestens einer Elektrode aufgeteilt sind und jede Gruppe über ein Hochspannungskabel und einem/r Schalter/Funkenstrecke mit ihrer/m eigenen Hochspannungsquelle/Marx-Generator verbunden ist (Anspruch 6).

Die an der Innenwand mit ihrer Stirn exponierten, mit der Transport-/Prozeßflüssigkeit unmittelbar in Kontakt stehenden Elektroden haben zur Felderzeugung im Reaktorinnern folgende Flächenaufteilung:

Die Summe der im Reaktor exponierten Oberflächen der mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektroden ist etwa gleich der am nächsten benachbarten, geerdeten Elektroden und wird bei Einrechnung der übernächsten geerdeten Elektroden nicht wesentlich unterschritten (Anspruch 7). Dabei soll die Fläche der Elektroden so dimensioniert werden, dass das Aspektverhältnis der Elektrodenfläche F zum Abstand d zwischen der jeweiligen

Hochspannungselektrode und den korrespondierenden geerdeten Elektroden den Wert

$$F : d = 1/2 \text{ cm}$$

nicht unterschreitet (Anspruch 8). Die elektrolytische Stromdichte soll etwa gleich sein. Ein noch größeres Aspektverhältnis führt zu noch homogenen Feldstärkeverteilungen, erhöht aber die elektrolytischen Verluste unverhältnismäßig.

Die Elektroden sind derart auf dem jeweiligen Längsbereich des Reaktors verteilt, dass es kein Elektrodenpaar aus einer geerdeten und einer mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektrode gibt, deren gerade Verbindungslinie senkrecht zur Strömungsrichtung des Prozessguts bzw. senkrecht zur Transportachse im Reaktor steht Ansprüche 3 und 9. Damit kommt keine Elektrodengruppe bei der Projektion senkrecht zur Durchströmungsachse mit einer geerdeten Elektrode zur Deckung. Bei dieser Projektion liegen die geerdeten Elektroden gewissermaßen immer um eine Elektrodengruppe herum, jedoch so, dass zu entfernteren geerdeten Elektroden zwischen den nahe liegenden immer ein ausreichender elektrischer Durchgriff zur Felddausbildung besteht.

Hinsichtlich der Durchsatzzeit hat sich gezeigt, dass wenn die Elektroden derart auf dem jeweiligen Längsbereich verteilt sind, dass bei der Projektion des Längsbereichs mit den mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektroden senkrecht zur Strömungsrichtung auf den Längsbereich mit geerdeten Elektroden sich die ersteren Elektroden jeweils auf einer geschlossenen, einfach gekrümmten Linie oder auf einem Liniensektor davon um eine geerdete Elektrode liegen (oder auch bei umgekehrter Projektion), sich diese Durchsatzzeit spürbar herabsetzen lässt.

Im Gegensatz zu den bereits obengenannten thermischen und mechanischen Verfahren zerstören gepulste, elektrische Felder mit Feldstärken im Bereich von 1-100 kV/cm Zellmembrane irre-

versibel. Die Elektroporation taugt zur effektiveren Gewinnung der Inhaltsstoffe des Zytoplasmas biologischer Zellen und zur Abtötung von Mikroorganismen. Dabei entstehen Poren in der Zellmembrane, wachsen und verschließen sich unter dem Einfluß thermischer Fluktuation und lokaler elektrischer Felder. Modellhaft wird angenommen, dass hydrophile, Wasser nicht durchlässige, für den Stoffaustausch geeignete Poren in einem zweistufigen Prozeß entstehen. Sie treten zunächst als Wasser nicht durchlässige, hydrophobe Poren in Erscheinung, deren Bildungsrate von der Temperatur und dem Membranpotential abhängt. Erreichte ihr Radius einen kritischen Wert, wandeln sie sich sofort in hydrophile Poren um. Letztere können unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes wachsen. Überschreitet ihr Radius während der Pulsdauern einen zweiten kritischen Wert, so ist die Öffnung irreversibel. Die Zeitsskala, innerhalb der die Poren sich öffnen, liegt erfahrungsgemäß im Bereich einer Mikrosekunde. Nur über diese Zeitspanne muß das äußere elektrische Feld angelegt sein. Bei Anlegen von stark überhöhten elektrischen Feldstärken, ab 10 kV/cm, kann sich diese Zeitspanne verringern.

Jede Verlängerung der Pulsdauer über den Zeitpunkt hinaus, an dem die Zellmembranen zerstört sind, erhöht nur die unvermeidlichen elektrolytischen Verluste in der Suspension. Daraus folgt, daß zur Erzielung mikrosekundenlanger sehr hoher Feldstärken über große Abstände in jedem Fall Spannungspulse von vielen 100 kV Amplitude erforderlich sind und zur Erzielung eines hohen Durchsatzes eine möglichst hohe Wiederholfrequenz der Pulse eingestellt werden muß.

Für eine solche Anlage/Einrichtung muß die Standzeit der Impulsgeneratoren industriellen Standards entsprechen. Mit Marx-Generatoren sind solche Eigenschaften einstellbar. Pulstransformatoren lassen sich für solche kurzen zeitlichen Vorgänge

nicht mehr mit vertretbarem Aufwand bauen und sind daher als Baukomponente unwirtschaftlich.

Im Marx-Generator werden zunächst Hochspannungskondensatoren parallel auf eine Ladepannung von z. B. 50 kV aufgeladen und dann in Serie geschaltet, um die Einzelspannungen zu addieren. Für beispielsweise zehn Kondensatoren ergibt sich beim Durchschalten der Funkenstrecken einfach eine Amplitude von 500 kV. Die weiteren Parameter werden mit Hilfe der Zeitkonstanten τ des durchgeschalteten elektrischen Kreises mit:

$$\tau = RC < 1 \mu s$$

bestimmt. R ist im wesentlichen der Widerstand der Suspension von Wasser und der biologischen Zellen und C die Kapazitäten der seriell geschalteten Kondensatoren eines Marx-Generators. Induktive R-L-Glieder sind bei dieser Anwendung vergleichsweise klein und damit hier vernachlässigbar.

Für das verfahrenstechnisch brauchbare Arbeiten des Reaktors ist der Einsatz von Marx Generatoren als Spannungsquelle für die Elektroporation entscheidend. Zuckerrüben als Beispiel werden mit einer von außen angelegten Feldstärke von 10 kV/cm effektiv elektroporiert, wenn der durchgeschaltete Marx-Generator 500 kV Pulse liefert und der Reaktor eine lichte Weite von 50 cm hat. Obwohl die Feldstärke mit 10 kV/cm sehr hoch ist, wird erfahrungsgemäß nur ein Teil der Rübenzellen aufgeschlossen. Für den anderen Teil ist die von außen angelegte Feldstärke noch nicht ausreichend hoch. Der Grund ist: biologische Zellen sind in den meisten Fällen länglich. Zur Modellbeschreibung dient eine an die Zellenform angelehnte lange z- und eine kurze r-Achse. Liegt die Zelle mit ihrer Länge z beispielsweise parallel zur örtlichen Feldrichtung, baut sich entlang eine Potentialdifferenz von $U = z E$ auf, die die Elektroporation zulässt und bewirken kann. Anders kann es sich an der kurzen r-Achse von Zellen verhalten, an der das kleinere Potential $U = 2r E$ anliegt, falls r in etwa der Ra-

dius der länglichen Zelle ist. Eine ovale Zelle mit beispielsweise den Ausmaßen $z = 100 \mu\text{m}$ und $2r = 10 \mu\text{m}$ soll elektroporiert werden. Bei einer Feldstärke von 1 kV/cm und einer Pulsdauer von Mikrosekunden wird die Porationsschwelle von hier zellsubstanzspezifisch 10 V nicht erreicht, weil

$$2rE = 10 \mu\text{m} \times 1\text{kV/cm} = 1\text{V}$$

ist. Eine mit der kleinen Achse zum Feld orientierten Zelle überlebt. Wären Feld und Achse gleichgerichtet gewesen, wäre es zur irreversiblen Membranöffnung gekommen.

Für Pulse im Mikrosekundenbereich liegt die Schwelle für irreversible Elektroporation bei der Potentialdifferenz von ca. 10 V . Diese Schwelle, aber auch Abschirmeffekte durch anisotropen Stromfluß, führen dazu, daß zur sicheren Elektroporation mit überhöht angelegter Feldstärke operiert werden, Schwellenpotentialdifferenz im Bereich 100 V , und zusätzlich die Frucht in verschiedene Positionen gedreht werden muß, um an den Zellen den Effekt der Elektroporation hochwahrscheinlich auszulösen.

Die Erfindung wird im folgenden anhand der Zeichnung näher erläutert. Die Zeichnung besteht aus den Figuren 1 bis 5 und skizziert als einfachstes Beispiel den Reaktor mit viereckigem Querschnitt.

Die Figuren zeigen im einzelnen:

Figur 1 den Reaktor in Draufsicht,

Figur 2 den Reaktor in Seitenansicht,

Figur 3 den Reaktor durch eine Stirn,

Figur 4 den schematischen Aufbau des Reaktors,

Figur 5 qualitativer Feldstärkeverlauf.

Am elektrischen Feld sich orientierende Messungen bei Rüben haben gezeigt, daß durch Erfassung aller Zellen die spezifische Energie, bezogen auf die Rübe, von 8 kJ/kg auf ca. 2 kJ/kg gesenkt wird. Neben der unvollständigen Elektroporation in ei-

ner Rohranordnung hat sich auch das Fördern ganzer Früchte im Rohr als nachteilig erwiesen, da es zu Verkantungen und Verkeilungen und damit einem Prozessgutstau kommt, der manuell beseitigt werden muß. Daher wird in dieser Erfindung einer Förderung der Vorzug gegeben, bei der auf die Früchte eine kontinuierliche Transportkraft ausübt wird, wie das z. B. beim Kettenförderer geschieht.

Der Durchsatz eines Kettenförderers wird bestimmt durch die Fördergeschwindigkeit, die Breite, in Höhe und den Grad der Befüllung. In Abhängigkeit des biologischen Zellenmaterials beträgt die Höhe des Förderers ca. 50 cm; die Fördergeschwindigkeit wird so eingestellt, daß während der Verweilzeit im Reaktor die durch Hochspannungspulse herangetragene spezifische Energie den gewünschten Schwellenwert erreicht hat. Die Breite des Reaktors ist keinen Einschränkungen unterworfen.

Der Reaktor hat hier einen rechteckigen Querschnitt und ist aus dielektrischem, für den Prozeß in allen Belangen hinreichend zähem Material gefertigt. Die beweglichen Teile, wie Bänder mit Querrippen etc. sind ebenfalls aus dielektrischem Material. Die Höhe des Reaktors ist hier ca. 50 cm, die Länge L ist beispielsweise 200 cm und die Breite 100 cm. An der unteren Seite sind die geerdeten Elektroden eingebaut, die obere Seite hat die hochspannungsführenden Elektroden, wobei jede Gruppe gleichzeitig mit Hochspannung aus einem zugehörigen Marxgenerator beaufschlagbarer Elektroden hier nur aus einer einzigen Elektrode besteht. Der Abstand zweier geerdeter Elektroden ist 50 cm ebenso der der mit Hochspannung beaufschlagbaren.

In Figur 1 ist das Elektrodenschema am Reaktor dargestellt. Alle Punkte stellen die geerdeten Elektroden dar. Die hochspannungsführenden Elektroden sind als Kreuze dargestellt. Sie sind insgesamt gegenüber den geerdeten Elektroden so versetzt

und rotiert, daß sie in dieser Draufsicht zentriert liegen. Zumindest die mittlere Reihe von geerdeten Elektroden werden durch das durch den Reaktor durchlaufende dielektrische Band des Kettenförderers, der hier nicht dargestellt ist, verdeckte. Das Band ist daher in diesem Bereich gelocht, so daß durch diese Durchbrüche darin eine von der relativen Dielektrizitätskonstanten des Kettenförderermaterials ungestörte Feldausbildung zwischen den beiden Elektrodenarten, geerdete und mit Hochspannung beaufschlagbare, stattfindet.

Hier beispielsweise sind 8 Marx Generatoren vorgesehen, d. h. die mit Hochspannung beaufschlagbaren Elektrodengruppen bestehen jeweils aus einer Elektrode. Die in den Figur 1 bis 3 zwischen den beiden Elektrodenarten eingezeichneten Pfeile deuten die Richtung des lokal überwiegend wirksamen elektrischen Feldes an. Aus der Darstellung der Draufsicht (Figur 1), der Seitenansicht (Figur 2) und der Vorderansicht (Figur 3) ist zu sehen, daß der überwiegende Anteil des lichten Raums im Reaktor von in der Richtung stark divergierenden Verbindungslinien durchkreuzt ist. Damit erst ist sichergestellt ist, daß das durchlaufende Prozessgut, Rüben plus Transportflüssigkeit, hier Wasser, das Rübenmaterial an jeder Stelle des Reaktors von elektrischen Feldlinien aus unterschiedlichen Richtungen durchsetzt wird.

Bei der Dimensionierung der Elektrodenfläche ist darauf zu achten, daß der elektrolytische Widerstand, bedingt durch den Stromfluß durch das Wasserbad und durch die Fruchtmasse den Gesamtwiderstand entsprechend der Beziehung

$$\tau = RC < 1 \mu s$$

nicht unterschreitet, das sonst die Pulslänge kleiner $1 \mu s$ wird und für die Elektroporation, wie oben erläutert, nicht mehr genügend lang ist. Bei beispielhaft einem elektrolytischen Widerstand von etwa $1,5 \text{ m}\Omega/\text{cm}$ und einen Elektrodenabstand von ca. 20 cm, sollen die scheibenförmigen Elektroden einen Durch-

messer von ca. 30 mm nicht überschreiten; das ergibt ein Aspektverhältnis von Elektrodenfläche zu Abstand von ca. $\frac{1}{2}$ cm. Bei grösseren Aspektverhältnissen verbessert sich zwar die Homogenität der Feldstärke, jedoch nehmen auch die elektrolytischen Verluste unverhältnismässig zu.

Es ist auch darauf zu achten, daß die Elektrodenfläche nicht zu klein gewählt wird. In einem solchen Fall verlagert sich der Bereich hoher Feldstärken aus dem Raum zwischen dem Elektroden in die direkte Umgebung der Elektroden, was zu vermeiden ist (siehe Figur 5).

Bei der Dimensionierung der Elektrodenfläche für einen Reaktor, wie er in den Figuren 1 und 2 dargestellt, ist zu beachten, daß die hochspannungsführenden Elektroden mehrere geerdete Elektroden in ihrer unmittelbaren Nachbarschaft haben. Daher sollen die am nächsten benachbarten geerdeten Elektroden zusammen die gleiche Fläche wie die hochspannungsführende Elektrode haben.

Figur 5 zeigt einerseits den Verlauf der elektrischen Feldstärke zwischen einer gerade mit Hochspannung beaufschlagten und einer beliebigen der geerdeten Elektroden. Es ergibt sich eine Feldstärkeüberhöhung in der Nähe der Elektroden und ein Absenken der Feldstärke im Raum dazwischen. Die Feldstärkeverzerrung ist eine Funktion der Elektrodenflächen. Für sehr kleine Elektrodenflächen geht die Feldstärke in Raum auf fast Null herunter. Die gleiche Situation ergibt sich auch, wenn eine kleine Elektrode einer wandförmigen Elektrode gegenübersteht, wenn z. B. das Reaktorgehäuse aus Metall anstatt aus dielektrischem Material bestünde. Eine hohe Feldliniendichte würde sich nur in der unmittelbaren Umgebung der kleinen Elektrode einstellen.

Figur 5 zeigt qualitativ den Verlauf der elektrischen Feldstärke zwischen einer gerade mit Hochspannung beaufschlagten und einer beliebigen der geerdeten Elektroden. Es ergibt sich eine Feldstärkeüberhöhung in der Nähe der Elektroden und ein Absenken der Feldstärke im Raum dazwischen. Die Feldstärkeverzerrung ist eine Funktion der Elektrodenflächen. Für sehr kleine Elektrodenflächen geht die Feldstärke in Raum auf fast Null herunter. Die gleiche Situation ergibt sich auch, wenn eine kleine Elektrode einer wandförmigen Elektrode gegenübersteht, wenn z. B. das Reaktorgehäuse aus Metall anstatt aus dielektrischem Material bestünde. Eine hohe Feldliniendichte würde sich nur in der unmittelbaren Umgebung der kleinen Elektrode einstellen. Figur 5 zeigt zusätzlich noch die Feldstärkeverteilung senkrecht zur Elektrodenanordnung also einer Richtung, die in etwa der Flussrichtung des Reaktors entspricht. Die Verteilung illustriert die Expansion der Feldstärke in das Reaktorvolumen und gibt Auskunft über die Feldverhältnisse zu einem naheliegenden Elektrodenpaar.

Zusammenfassung:

In einem Reaktorraum, der Bestandteil einer Prozessanlage zur Gewinnung von Nahrungsmittel bzw. Nahrungsmittelkomponenten ist, werden biologische Produkte in geernteter Form als ganze oder zerschnittene Stücke beim Durchlauf pulsformigen elektrischen Feldern ausgesetzt, die die Zellwände der Produkte porieren, d. h. irreversibel öffnen und so den Zellinhalt leichter zugänglich machen. Hierzu befinden sich in der Wand des Reaktorbereichs längs der Prozessgut-Durchlaufachse in einem Längsbereich mit Hochspannung beaufschlagbare Elektrodengruppen und in einem gegenüberliegenden Längsbereich Elektroden auf Erdpotential. Jede Elektrodengruppe ist über einen Schalter an einen schnellen elektrischen Energiespeicher, wie ein Marx-Generator beispielsweise, angeschlossen, um zwischen der gerade hochzufahrenden Elektrodengruppe und den geerdeten Elektroden elektrische Felder vielfältiger Richtung schnell aufzubauen. Es ist immer nur eine Elektrodengruppe für eine vorgegebene Zeit an Hochspannung.

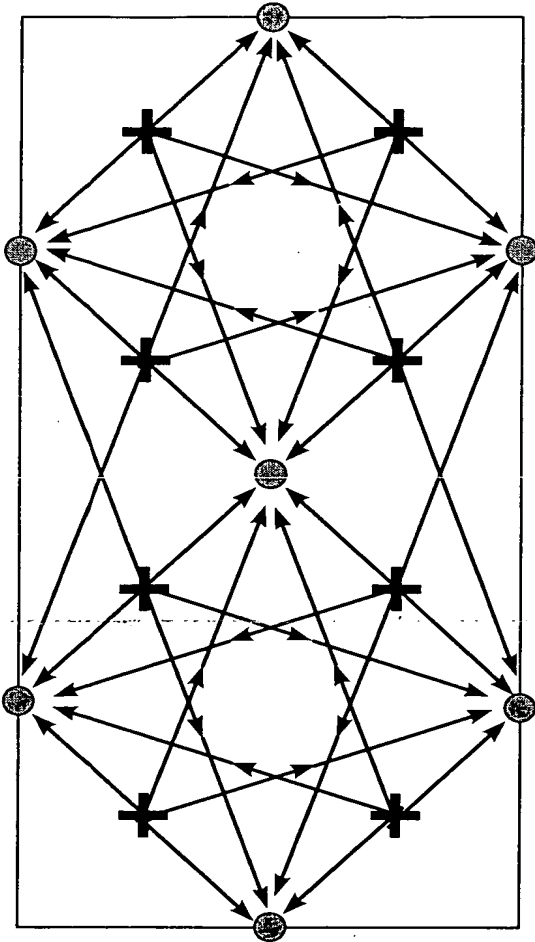


Fig. 1

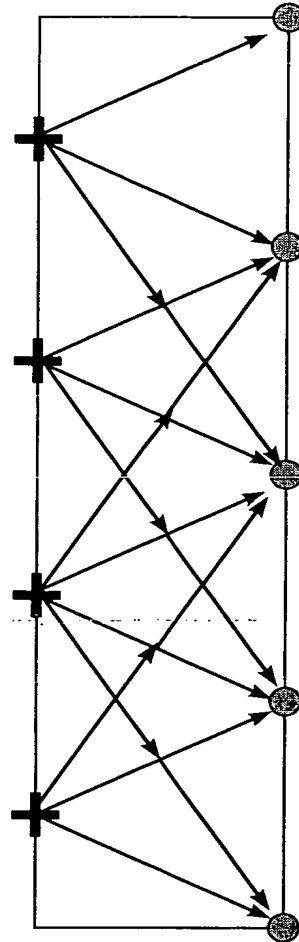


Fig. 2

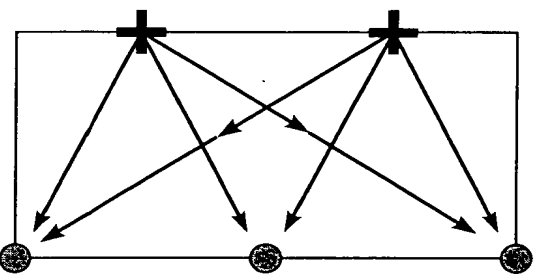


Fig. 3

Abbl: Reaktor mit positiven (+) und geerdeten (-) Elektroden, versehen mit Verbindungslinien, die eine grobe räumliche Orientierung des elektrischen Feldes wiedergeben. Oben links Draufsicht, oben rechte Seitenansicht und unten Querschnitt des Reaktors

Siehe folgende Graphik zur Illustration:

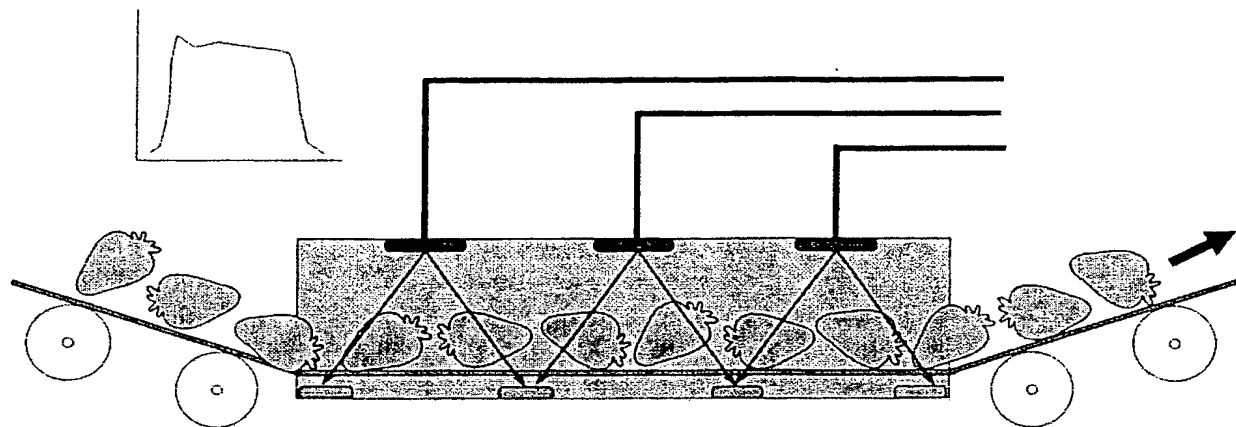


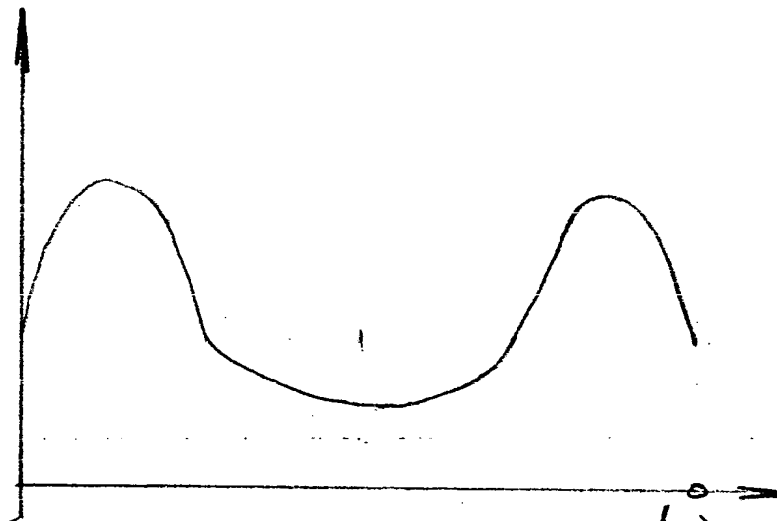
Fig. 5

HV Pulse

Feldstärke

E

$10 \frac{\text{kV}}{\text{cm}}$



x Elektrodenabstand

Fig. 5